



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 48 734 A 1**

⑥ Int. Cl.⁶
C 07 K 14/475
A 61 K 38/18

⑦ Aktenzeichen: 197 48 734.3
② Anmeldetag: 5. 11. 97
④ Offenlegungstag: 6. 5. 99

DE 197 48 734 A 1

⑦① Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Forstmeyer,
81541 München

⑦② Erfinder:
Kärst, Uwe, 38124 Braunschweig, DE; Müller,
Carsten, 38124 Braunschweig, DE; Rinas, Ursula,
38124 Braunschweig, DE; Weich, Herbert, 38124
Braunschweig, DE; Erdmann, Helmut, 38124
Braunschweig, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren aus der Cystein-Knoten-Familie sowie Verwendung der gewonnenen Dimere
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren aus der Cystein-Knoten-Familie, bei dem man von Zelleinschlußkörpern ausgeht, wobei man A entweder
- (i) die Einschlußkörper in einem wäßrigen alkalischen und harnstoffhaltigen Medium in Gegenwart eines an sich bekannten Reduktionsmittels solubilisiert,
 - (ii) das Solubilisat auf eine Ionenaustauschersäule aufträgt,
 - (iii) durch Rückfaltung, Dimerisierung und aerobe Re-Oxidation renaturiert, indem man mit einem absteigenden Harnstoffgradienten wäscht, und
 - (iv) mit einem Mineralsalzgradienten eluiert
- B oder
- (i) die Einschlußkörper in einem wäßrigen Medium in Gegenwart eines an sich bekannten Solubilisierungsmittels und eines an sich bekannten Reduktionsmittels solubilisiert,
 - (ii) gegebenenfalls das Solubilisat unter denaturierenden Bedingungen einer Gelfiltration unterwirft,
 - (iii) in fakultative Gegenwart eines an sich bekannten Solubilisierungsmittels und in Gegenwart eines an sich bekannten Redox-Mittels zu assoziationskompetenten Monomeren rückfaltet, indem man das Solubilisat einer Gelfiltration unterwirft,
 - (iv) die Wachstumsfaktoren im Eluat der Gelfiltration zu biologisch aktiven Dimeren mit Hilfe eines Redox-Mittels dimerisiert und
- C die gemäß (a) oder (b) dimerisierten Wachstumsfaktoren...

DE 197 48 734 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren. Bei der aktiven Form der Wachstumsfaktoren der Cystein-Knoten-Familie handelt es sich um

5 Homo- oder Heterodimere, die durch zwei Disulfidbrücken kovalent verbunden sind.

Die meisten Gene der in Rede stehenden Wachstumsfaktoren bestehen aus mehreren Exons. Bekannt ist, daß das Expressionsprodukt eines Gens verschiedene Proteine umfassen kann, was möglicherweise auf unterschiedliches Herausschneiden von Intron-RNA-Sequenzen beziehungsweise unterschiedliche Spleißformen zurückzuführen ist. So wurden beispielsweise für VEGF-A die Formen VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ beschrieben, die homogenisch bzw. aus einem Gen abgeleitet sind, vgl. Charnock-Jones et al. 1993. Im folgenden sollen unter Homodimeren nur homogenische Homodimere aus zwei identischen Peptidketten verstanden werden. Alle aus unterschiedlichen Peptiden zusammengesetzten Proteine, und zwar sowohl aus homogenischen als auch aus heterogenischen Peptiden, sollen als Heterodimere verstanden werden.

Die Herstellung von biologisch aktiven dimeren Wachstumsfaktoren ist bisher ein sehr aufwendiger Prozeß mit geringer Ausbeute, wozu beispielsweise auf die Gewinnung von PDGF (Platelet-derived growth factor) verwiesen werden kann; Hoppe et al. 1989. So sieht die bekannte PDGF-Gewinnung im wesentlichen folgende Maßnahmen vor:

- (i) Solubilisierung aus den Zelleinschlußkörpern mit 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium-HCl in Gegenwart eines Reduktionsmittels,
- 20 (ii) Schützen der freien Thiolgruppen durch Sulfonierung,
- (iii) 4-stufiges Reinigen und Rückfalten der (biologisch inaktiven) Monomeren.
- (iv) Schließlich Dimerisierung der Monomeren in Gegenwart von Glutathion mit Reinigung der Dimeren und Abtrennung von nicht umgesetzten Monomeren.

25 Die Ausbeute des Dimerisierungsschrittes allein beträgt nur etwa 10%; Hoppe et al. 1989.

Das für PDGF bekannte Verfahren läßt sich bekanntlich auch auf die Wachstumsfaktoren VEGF-A (Vascular endothelial growth factor) und PlGF-1 (Placenta growth factor) als Beispiel für weitere Vertreter aus der Familie der Cystein-Knoten-Proteine übertragen; Birkenhäger et al. 1996. Abgesehen von der wiederum geringen Ausbeute dieses bekannten Verfahrens befriedigt nicht, daß erst im letzten Schritt biologisch aktives Dimer neben inaktivem Dimer gebildet wird, so

30 daß eine weitere Reinigung erforderlich ist und die Aktivität während der Reinigung nicht kontrolliert werden kann.

Erfindungsgemäß wird nun ein Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren aus der Cystein-Knoten-Familie vorgeschlagen, bei dem man von Zelleinschlußkörpern ausgeht, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 35 (A) entweder
 - (i) die Einschlußkörper in einem wäßrigen alkalischen und harnstoff-haltigen Medium in Gegenwart eines an sich bekannten Reduktionsmittels solubilisiert,
 - (ii) das Solubilisat auf eine Ionenaustauschersäule aufträgt,
 - 40 (iii) durch Rückfaltung, Dimerisierung und aerobe Re-oxidation renaturiert, indem man mit einem absteigenden Harnstoffgradienten wäscht, und
 - (iv) mit einem Mineralsalzgradienten eluiert
- (B) oder
 - (i) die Einschlußkörper in einem wäßrigen Medium in Gegenwart eines an sich bekannten Solubilisierungsmittels und eines an sich bekannten Reduktionsmittels solubilisiert,
 - 45 (ii) gegebenenfalls das Solubilisat unter denaturierenden Bedingungen einer Gelfiltration unterwirft,
 - (iii) in fakultativer Gegenwart eines an sich bekannten Solubilisierungsmittels und in Gegenwart eines an sich bekannten Redox-Mittels zu assoziationskompetenten Monomeren rückfaltet, indem man das Solubilisat einer Gelfiltration unterwirft,
 - (iv) die Wachstumsfaktoren im Blut der Gelfiltration zu biologisch aktiven Dimeren mit Hilfe eines Redox-Mittels dimerisiert und
 - 50 (C) die gemäß (A) oder (B) dimerisierten Wachstumsfaktoren feinreinigt, indem man sie weiteren für die Reinigung von rekombinanten Proteinen an sich bekannten Reinigungsschritten unterwirft.

55 Variante A

- (i) Binschlußkörper werden also alkalisch in Gegenwart von Harnstoff und vorzugsweise bei geringer Harnstoffkonzentration solubilisiert.
- (ii) Die solubilisierten Proteine werden an einen Ionenaustauscher gebunden.
- 60 (iii) bis (iv) Der Harnstoff wird in Analogie zu einer Dialyse allmählich graduell entfernt, die Monomeren werden rückgefaltet und unter Rückbildung von Disulfidbrücken dimerisiert und die Disulfidbrücken der gebildeten Dimeren werden durch Luft oder Sauerstoff, insbesondere durch gelösten Sauerstoff, reoxidiert, so daß man durch Rückfaltung, Dimerisierung und Reoxidation renaturiert.

65 Bei der Gewinnung eines speziellen Dimeren kann man dem spezifischen Verhalten dieses Dimeren dadurch Rechnung tragen, daß man

- (a) während der Solubilisierung und der Chromatographie die Harnstoff- und Reduktionsmittelkonzentration,

- (b) während des Waschens die Flußrate sowie
- (c) beim Auftragen auf die Säule das Verhältnis der aufgetragenen Proteinmenge zur Säulenkapazität optimiert.

Für rhplGF-1 kann man beispielsweise an eine Harnstoffkonzentration von etwa 1 M und einen Tris-Puffer mit einem pH von etwa 8,0 denken und für PDGF-BB beispielsweise an eine Harnstoffkonzentration von etwa 1,5 M und einen Puffer mit einem pH von etwa 8,5. 5

Durch eine Ko-Solubilisierung und Ko-Chromatographie lassen sich vergleichsweise einfach heterodimere Liganden gewinnen, etwa von PlGF-1 und VEGF₁₂₁. Eine stöchiometrische Koexpression ist bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht notwendig.

Wenn man gemäß Variante A arbeitet, kann man die Feinreinigung mit Hilfe von Heparin-Affinitätschromatographie, Kationenaustauscher-Chromatographie, Affinitätschromatographie, Gelfiltration und/oder Elutions-Elektrophorese durchführen. 10

Jederzeit sind Aktivitätstests möglich. Der Nachweis der biologischen Aktivität kann beispielsweise durch spezifische ELISAs oder durch Kompetitionsassays für die Rezeptorbindung, beispielsweise mit sFlt-1 und ¹²⁵I-VEGF₁₆₅, und ³[H]-Thymidin-Einbau für die Stimulierung der Mitose erfolgen. Für die Mitose-Stimulierung beispielsweise in Balb 3T3-Zellen vergleiche man Klagsbrunn et al. 1985 und Weich et al. 1990. 15

Variante B

Wenn man bei dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens die Bedingungen für die Gewinnung von speziellen Homo- oder Heterodimeren optimieren will, so kann man folgende Faktoren in Betracht ziehen. 20

- (a) Konzentration chaotroper Reagenzien,
- (b) Flußrate.
- (c) Redoxverhältnis zur Generierung der Disulfidverbrückungen während der Renaturierungen,
- (d) Beladung.
- (e) Proteinkonzentration. 25

Die Dimerisierungsreaktion läuft also in einem Red-Ox-System ab, wobei die Disulfidverbrückungen oxidativ gebildet wären, während falsch gebildete intra- und intermolekulare Brücken durch das Red-Ox-System wieder aufgelöst werden können. Für die Dimerisierungsreaktion kann man andere Umgebungsparameter einstellen als für die Rückfaltung auf der Säule, beispielsweise durch spezielle Einstellung der Temperatur. 30

Wenn man nach der Variante B arbeitet, kann man die Feinreinigung mit Hilfe von Gelfiltration und/oder Heparin-Affinitätschromatographie durchführen.

Biologische Aktivität kann man beispielsweise durch ³[H]-Thymidin-Einbau bei Stimulierung der DNA-Synthese und die daraus abgeleiteten Mitose-Stimulierung beispielsweise in Balb 3T3-Zellen nachweisen; vergleiche Klagsbrunn et al. 1985 und Weich et al. 1990. 35

Varianten A und/oder B

Als Reduktionsmittel kann man Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) verwenden. 40

Für die aerobe Re-Oxidation kann man ein lufthaltiges oder sauerstoffhaltiges wäßriges Medium verwenden, insbesondere ein gepuffertes Medium.

Als Mineralsalzgradienten kann man einen NaCl-Gradienten verwenden.

Als Solubilisierungsmittel kann man Guanidinium-Hydrochlorid verwenden. 45

Als Redox-Mittel kann man Glutathion verwenden.

Die Feinreinigung kann durch Aktivitätstests überwacht werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren kann man von Zelleinschlußkörpern reifer Formen der Wachstumsfaktoren ohne Leader-Sequenz ausgehen.

Dabei kann man von Zelleinschlußkörpern eines Wachstumsfaktors ausgehen, dessen Moleküle, die die Zelleinschlußkörper bilden, sich aus einem einzigen Gen ableiten bzw. homogenisch sind und (im vorstehend angegebenen Sinn) Homodimere oder Heterodimere bilden. Natürlich kann man auch Zelleinschlußkörper eines Wachstumsfaktors dem erfindungsgemäßen Verfahren unterwerfen, dessen Moleküle heterogenisch sind. 50

Man kann auch von Zelleinschlußkörpern zweier verschiedener Wachstumsfaktoren ausgehen, deren Moleküle, die die Zelleinschlußkörper bilden, sich aus verschiedenen Genen bzw. aus Genen ableiten, die für jeden Wachstumskörper spezifisch sind. 55

Dabei können sich die Moleküle der Einschlußkörper eines oder beider Wachstumsfaktoren aus einem einzigen Gen ableiten bzw. homogenisch sein, oder die Moleküle der Einschlußkörper eines oder beider Wachstumsfaktoren können heterogenisch sein.

Erfindungsgemäß kann man von Zelleinschlußkörpern eines Wachstumsfaktors einer Aminosäuresequenz aus der durch SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23 und SEQ ID NO. 24 gebildeten Gruppe ausgehen. 60

Ferner kann man erfindungsgemäß ein Dimer aus zwei gleichen Ketten einer Aminosäuresequenz aus der durch SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, 65

SEQ ID NO. 23 und SEQ ID NO. 24 gebildeten Gruppe gewinnen.

Ferner kann man erfindungsgemäß ein Dimer aus zwei verschiedenen Ketten mit Aminosäuresequenzen gewinnen, die man aus einer der folgenden Zusammenstellungen von Aminosäuresequenzen ausgewählt hat: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 und SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 7 und SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 und SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11 und SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 11 und SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 13 und SEQ ID NO. 14; SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20 und SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23 und SEQ ID NO. 24.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäß gewonnenen biologisch aktiven Dimers von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten.

Nachstehend wird die Erfindung durch Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Aufarbeitung von VEGF₁₆₅ und Gewinnung der aktiven Homodimere aus Zelleinschlußkörpern aus Zellen des E. coli-Stammes JM 109 (Vektorbasis: pCYTEXP3)

Man solubilisiert die Zelleinschlußkörper bei pH 12,5 gemäß Suttnar et al. 1994 in 50 mM Glycinpuffer unter Zusatz von 10 mM Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) und 1 M Harnstoff. Hierfür werden pro Gramm Zelleinschlußkörper 5 ml des vorstehend angeführten Solubilisierungspuffers zugegeben. Man rührt bei Raumtemperatur unter Stickstoff 16 h lang.

Die Lösung wird danach 60 min lang bei 35266* g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand, das Solubilisat, wird auf eine mit 50 mM Glycinpuffer (pH 9,0) und 1 M Harnstoff equilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen (pharmacia XK 26/40, 60 ml Betrvolumen, Q-Sepharose, 2 ml/min bei 4°C; 24 ml mit 687 mg Protein aus 4 g Zelleinschlußkörpern).

Die Säule wird zuerst mit Startpuffer und dann mit einem linear absteigenden Harnstoffgradienten (1 M auf 0 M) bei einer Flußrate von 0,25 ml/min (entspricht 0,047 cm/min) gewaschen. Bei diesem Schritt bleiben entstehende Dimere gebunden, eventuell noch vorhandene Monomere werden eluiert, so daß sie nach Optimierung der Bedingungen überhaupt nicht mehr nachweisbar sind. Nach einem Waschschrift mit 50 mM Glycinpuffer (pH 9,0) werden dann die aktiven Dimere mit einem NaCl-Gradienten eluiert.

Die VEGF-haltigen Fraktionen werden gesammelt, verdünnt (1 : 3) und auf eine 10 ml-Heparin-Säule (Toyopearl AF-Heparin-650-M) aufgetragen, die mit 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,2) equilibriert ist. Die Säule wird mit Puffer gewaschen und das VEGF mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die VEGF-haltigen Fraktionen werden gesammelt, wiederum verdünnt (1 : 3) und auf eine mit 50 mM Tris-HCl equilibrierte Kationenaustauschersäule (S-Sepharose) aufgetragen und mit einem Stufengradienten (0,2 M; 0,4 M und 1,0 M NaCl) eluiert. Für weitere Einzelheiten vergleiche man die folgende Tabelle 1.

Tabelle 1: Reinigung von homodimeren VEGF₁₆₅[#]

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Protein [mg]	VEGF ₁₆₅ [mg]	Ausbeute [%]
Solubilisat	24	28,62	686,9	189	100
Q-Sepharose	187	1,02	191,5	134	70,9
AF-Heparin-650-M	214	0,42	89,9	81	42,9
S-Sepharose	35	2,14	75	75	39,7

[#]bei Einsatz von 4 g Zelleinschlußkörpern

Für VEGF₁₆₅, das außer an Flt-A auch an den mitogenen Rezeptor KDR bindet, kann man durch Messung der Stimulierung der DNA-Syntheserate zeigen, daß die Aktivität von rekombinantem unglykosilierten Protein aus E. coli mit der von im Baculovirus-System hergestellten VEGF nahezu identisch ist.

Beispiel 2

Aufarbeitung von PDGF-AB und Gewinnung der aktiven Heterodimere aus Einschlußkörpern von *E. coli* TG1 (Vektorbasis: pCYTEXP3)

5

Die aus einer Hochzelldichtekultivierung gewonnenen Zellen werden durch Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen und die Einschlußkörper durch Zentrifugieren von der löslichen Fraktion abgetrennt. Dieses Konzentrat wird dreimal mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 0,5 mM EDTA und 2% Brij 35 gewaschen, anschließend mit 6 M Gnd-HCl, 100 mM DTT, 0,5 mM EDTA mit Ultraschallunterstützung solubilisiert und über Nacht stehengelassen. Nach Zentrifugieren (40 min bei 26 000 g und 4°C) wird eine Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (2 M Gnd-HCl und Glycin-Phosphat (pH 3,0)), die das Protein zu über 90% rein liefert.

Dazu wird eine Säule (XK 26/60-Säule, Superdex 75 pg, Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 348 ml und folgender Spezifizierung verwendet; Beladung 10 ml (2,9%); Flußrate: 4 ml \times min⁻¹; PDGF-Konzentration: 5 mg \times ml⁻¹.

Zur Rückfaltung wird die PDGF-Stammlösung (4,5 mg \times ml⁻¹) auf dieselbe Gelfiltrationssäule gegeben, die mit 100 mM Tris-HCl (pH 7,8) und 0,5 M Gnd-HCl und Glutathion (reduziert/oxidiert; 40 : 1) equilibriert ist, wobei man bei einer Flußrate von 2 ml \times min⁻¹ eluiert. Der Verlauf der UV-Absorption zeigt dabei im wesentlichen einen Peak bei dem Elutionsvolumen $V_E = 161$ ml, der lediglich PDGF-A/B-Monomere enthält.

Die Dimerisierung dieser Monomere mit Hilfe des Red-Ox-Systems findet im Eluat statt und ist eine im Stundenbereich verlaufende Reaktion.

Erzielter Reinheitsgrad und Ausbeute sind der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2

Reinigung von PDGF-AB

25

Prozeßschritt	Reinheitsgrad [%]	Ausbeute [%]
Solubilisierung	40	100
Reinigung	> 90	90
Rückfaltung	> 90	88
Dimerisierung	> 90	60
Heparinaffinität	> 95	66
Total		31

Die biologische Aktivität kann durch ³[H]-Thymidin-Einbau für die Stimulierung der DNA-Synthese bzw. für die Mitose-Stimulierung in Balb 3T3-Zellen gemäß Klagsbrunn et al. 1985 und Weich et al. 1990 erfolgen. Mit einer PDGF-AB-Konzentration von 3 bis 5 ng \times ml⁻¹ läßt sich eine halbmaximale Stimulierung erreichen, die der von anderen Autoren berichteten Stimulierung entspricht; vgl. Schneppe et al. 1994.

Mit kommerziellen pDGF-AB aus *E. coli* [SIGMA] läßt sich dasselbe Ergebnis erreichen

45

Literatur

- R. Birkenhäger, B. Schneppe, W. Röckl, J. Wiltng, H. A. Weich, J. E. G. McCarthy. *Biochem. J.* 316 (1996) 703-707.
D. S. Chamock-Jones, A. M. Sharkey J. Rajput-Williams, D. Burch, J. P. Schofield, S. A. Fountain, C. A. Boocock, S. K. Smith. *Biology of Reproduction* 48 (1993) S. 1120-1128.
J. Hoppe, H. A. Weich, W. Eichner. *Biochemistry* 28 (1989), 2956-2960.
J. Hoppe, H. A. Weich, W. Eichner, D. Tatje. *Eur. J. Biochem.* 187 (1990), 207-214.
M. Klagsbrunn, Y. Shing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), 805-809.
B. Schneppe, W. Eichner, J.E.G. McCarthy. *Gene* 143 (1994), 201-209.
J. Suttmar, J.E. Dyr, E. Hamsikova, J. Novák, V. Vonka. *J. Chromatogr. B*, 656 (1994) 123-126.
H.A. Weich, N. Iberg, M. Klagsbrunn, J. Folkman. *Growth Factors* 2 (1990), 313-320.

60

65

1. Informationen zu Sequenz ID 1: VEGF-A121

Charakteristika:

Länge: 121 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 1

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPL
 MRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGQHIGEMSFLQHNKCECRPK
 KDRARQEKCDKPRR

1. Informationen zu Sequenz ID 2: VEGF-A145

Charakteristika:

Länge: 145 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 2

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPL
 MRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGQHIGEMSFLQHNKCECRPK
 KDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVCDKPRR

3. Informationen zu Sequenz ID 3: VEGF-A165

Charakteristika:

Länge: 165 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 3

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPL
 MRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGQHIGEMSFLQHNKCECRPK
 KDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKSCKNLDSRCKARQLELNERTCRC
 DKPRR

4. Informationen zu Sequenz ID 4: VEGF-A189

Charakteristika:

Länge: 189 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 4

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPL
 MRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGQHIGEMSFLQHNKCECRPK
 KDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWVPCGPCSERRKHLFVQDPQTC
 KCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

5. Informationen zu Sequenz ID 5: VEGF-B186

Charakteristika:

Länge: 186 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 5

PVSQPDAPGHQRKVVSVIDVYTRATCQPREVVVPLTVELMGTVAKQLVPSCVT
 VQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQVRMQILMIRYPSSQLGEMSLEEHSQCECRPK
 KKDSAVKPDRAATPHHRPQPRSVPGWDSAPGAPSPADITHPTAPGPSAHAAPS
 TTSALTPGPAAAAADAAASSVAKGGA

6. Informationen zu Sequenz ID 6: VEGF-B167

Charakteristika:

Länge: 167 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 6

PVSQPDAPGHQRKVVSVIDVYTRATCQPREVVVPLTVELMGTVAKQLVPSCVT
 VQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQVRMQILMIRYPSSQLGEMSLEEHSQCECRPK
 KKDSAVKPDSPRPLCPRCTQHHQRPDPRTCRCRCRRRSFLRCQGRGLELNPDT
 CCRKLR

7. Informationen zu Sequenz ID 7: VEGF-C

Charakteristika:

Länge: 317 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 7

RTEETIKFAAAHYNTEILKSIDNEWKRTQCMPREVCIDVGKEFGVATNTFFKPPC
 VSVYRCGGCCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRC
 MSKLDVYRQVHSIIRSLPATLPQCQAANKTCPTNYMWNNHICRCLAQEDFMF
 SSDAGDDSTDGFHDICGPNKELDEETCQCVCRAGLRPASCOPHKELDRNSCQC
 VCKNKLFPSCGANREFDENTCQCVCCKRTCPRNQPLNPGKCAECTESPQKCL
 LKGKKFHHQTCSCYRRPCTNRQKACEPGFSYSEEVCRCCVPSYWKRPM

8. Informationen zu Sequenz ID 8: VEGF-C113

Charakteristika:

Länge: 113 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 8

RTEETIKFAAAHYNTEILKSIDNEWKRTQCMPREVCIDVGKEFGVATNTFFKPPC

VSVYRCGGCCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRC
MSK

5

9. Informationen zu Sequenz ID 9: FIGF (VEGF-D)

Charakteristika:

Länge: 338 Aminosäuren
Art: Aminosäure
Topologie: linear
Art des Moleküls: Protein

10

Sequenzbeschreibung ID 9

15

GFRSEHGPKDFSFERSSRSMLEERSEQQIRAASSLEELLQIAHSEDWKLWRCRL
KLKSLASMDSRASHRSTRFAATFYDTETLKVIDEEWQRTQCSPRETCVEVASE
LGKTTNTFFKPPCVNVFRCGGCCNEEGVMCMNTSTSYISKQLFEISVPLTSVPEL
VPVKIANHTGCKCLPTGPRHPYSIIRRSIQTPEEDECPSHKKLCPIDMLWDNTKC
KCVLQDETPLPGTEDHSYLQEPTLCGPHMTFDEDRCECVCKAPCPGDLIQHPEN
CSCFECKESLESCCQKHKIFHPDTCSCEDRCPFHTRTCASRKPAACGKHWRFPKE
TRAQGLYSQENP

25

10. Informationen zu Sequenz ID 10 FIGF178 (VEGF-D178)

Charakteristika:

30

Länge: 178 Aminosäuren
Art: Aminosäure
Topologie: linear
Art des Moleküls: Protein

35

Sequenzbeschreibung ID 10

GFRSEHGPKDFSFERSSRSMLEERSEQQIRAASSLEELLQIAHSEDWKLWRCRL
KLKSLASMDSRASHRSTRFAATFYDTETLKVIDEEWQRTQCSPRETCVEVASE
LGKTTNTFFKPPCVNVFRCGGCCNEEGVMCMNTSTSYISKQLFEISVPLTSVPEL
VPVKIANHTGCKCLP

40

45

11. Informationen zu Sequenz ID 11: PlGF-1

Charakteristika:

Länge: 131 Aminosäuren
Art: Aminosäure
Topologie: linear
Art des Moleküls: Protein

50

Sequenzbeschreibung ID 11

LPVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEH
MFSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQH
VRCECRPLREKMKPERCGDAVPRR

55

60

12. Informationen zu Sequenz ID 12: PlGF-2

Charakteristika:

Länge: 152 Aminosäuren
Art: Aminosäure

65

Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein
 Sequenzbeschreibung ID 12

LPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEH
 MFSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQH
 VRCECRPLREKMKPERRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPRR

13. Informationen zu Sequenz ID 13: PDGF-A

Charakteristika:
 Länge: 125 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 13

SIEEAVPAVCKTRTVIYEIPRSQVDPTSANFLIWPPCVBVKRCTGCCNTSSVKCQ
 PSRVHHRSVKVAKVEYVRKKPKLKEVQVRLEEHLACACATTSLNPDYREEDTGRP
 RESGKKRKRRLKPT

14. Informationen zu Sequenz ID 14: PDGF-B

Charakteristika:
 Länge: 109 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 14

SLGSLTIAEPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDRTNANFLVWPPCVEVQRCSGCCNN
 RNVQCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCETVAAARPVT

15. Informationen zu Sequenz ID 15: BMP-2

Charakteristika:
 Länge: 113 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 15

AKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLAD
 HLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTLSAISMLYLDENEKVVLKNYQDM
 VVEGCGCR

16. Informationen zu Sequenz ID 16: BMP-3

Charakteristika:
 Länge: 110 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 16

QWIEPRNCARRYLKVDFAIGWSEEWIISPKSFDAYYCSGACQFPMPKSLKPSN
 HATIQTIVRAVGVVPGIPEPCCVPEKMSSLSILFFDENKNVVLKVYPNMTVESACR

17. Informationen zu Sequenz ID 17: BMP-4

Charakteristika:

Länge: 115 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 17

SPKHHSQRARKKNKNCRRHSLYVDFSDVGWVNSVNSSIPKACCVPTLSAISM
 LYLDEYDKVVLKNYQEMVVEGCGCR

18. Informationen zu Sequenz ID 18: BMP-5

Charakteristika:

Länge: 132 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 18

NQNRNKSSSHQDSSRMSSVGDYNTSEQKQACKKHELYVSFRDLGWQDWIAPPE
 GYAAFYCDGECSSFPLNAHMNATNHAIVQTLVHLMFPDHVPKPCCAPTCLNAIS
 VLYFDDSSNVILKKYRNMVVRSCGCH

19. Informationen zu Sequenz ID 19: BMP-6

Charakteristika:

Länge: 131 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 19

QSRNRSTQSQDVARVSSASDYNSSSELKTACRKHELYVSFQDLGWQDWIAPKG
 YAANYCDGECSSFPLNAHMNATNHAIVQTLVHLMNPBYVPKPCCAPTCLNAISV
 LYFDDNSNVILKKYRNMVVRACGCH

20. Informationen zu Sequenz ID 20: BMP-7

Charakteristika:

Länge: 138 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 20

TGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
 DWIAPPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT
 CLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

21. Informationen zu Sequenz ID 21: BMP-8

Charakteristika:

Länge: 138 Aminosäuren
 Art: Aminosäure
 Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 21

AVRPLRRRQPKKSNELPQANRLPGIFDDVHGSHGRQVCRRHELIVSFQDLGWL
DWVIAPQGYSAYYCEGECFPLDSCMNATNHAILQSLVHLMKPNVVPKACCAP
TKLSATSVLYYDSSNNVILRKHRNMVVKACGCH

22. Informationen zu Sequenz ID 22: TGF-β1

Charakteristika:

Länge: 112 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 22

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWS
LDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV
RSCKCS

23. Informationen zu Sequenz ID 23: TGF-β2

Charakteristika:

Länge: 112 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 23

ALDAA YCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLW
SSDTQHRSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKS
CKCS

24. Informationen zu Sequenz ID 24: TGF-β3

Charakteristika:

Länge: 112 Aminosäuren

Art: Aminosäure

Topologie: linear

Art des Moleküls: Protein

Sequenzbeschreibung ID 24

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRS
ADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVK
SCKCS

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren aus der Cystein-Knoten-Familie, bei dem man von Zelleinschlußkörpern ausgeht, dadurch gekennzeichnet, daß man

(A) entweder

- (i) die Einschlußkörper in einem wäßrigen alkalischen und harnstoff-haltigen Medium in Gegenwart eines an sich bekannten Reduktionsmittels solubilisiert,
- (ii) das Solubilisat auf eine Ionenaustauschersäule aufträgt,
- (iii) durch Rückfaltung, Dimerisierung und aerobe Reoxidation renaturiert, indem man mit einem abstei-

- genden Harnstoffgradienten wäscht, und
 (iv) mit einem Mineralsalzgradienten eluiert
- (B) oder
- (i) die Einschußkörper in einem wäßrigen Medium in Gegenwart eines an sich bekannten Solubilisierungsmittels und eines an sich bekannten Reduktionsmittels solubilisiert, 5
 - (ii) gegebenenfalls das Solubilisat unter denaturierenden Bedingungen einer Gelfiltration unterwirft,
 - (iii) in fakultativer Gegenwart eines an sich bekannten Solubilisierungsmittels und in Gegenwart eines an sich bekannten Redox-Mittels zu assoziationskompetenten Monomeren rückfaltet, indem man das Solubilisat einer Gelfiltration unterwirft, (iv) die Wachstumsfaktoren im Eluat der Gelfiltration zu biologisch aktiven Dimeren mit Hilfe eines Redox-Mittels dimerisiert und 10
- (C) die gemäß (A) oder (B) diimerisierten Wachstumsfaktoren feinreinigt, indem man sie weiteren für die Reinigung von rekombinanten Proteinen an sich bekannten Reinigungsschritten unterwirft.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reduktionsmittel Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) verwendet.
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man für die aerobe Re-oxidation ein lufthaltiges oder sauerstoffhaltiges wäßriges Medium verwendet, insbesondere ein gepuffertes Medium.
 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mineralsalzgradienten einen NaCl-Gradienten verwendet.
 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Solubilisierungsmittel Guanidinium-Hydrochlorid verwendet. 20
 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Redox-Mittel Glutathion verwendet.
 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man gemäß Anspruch 1(A) arbeitet und die Feinreinigung mit Hilfe von Heparin-Affinitätschromatographie, Kationenaustauscher-Chromatographie, Affinitätschromatographie, Gelfiltration und/oder Elutions-Elektrophorese durchführt. 25
 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man gemäß Anspruch 1(B) arbeitet und die Feinreinigung mit Hilfe von Gelfiltration und/oder Heparin-Affinitätschromatographie durchführt.
 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Feinreinigung durch Aktivitätstests überwacht.
 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man von Zelleinschlußkörpern reifer Formen der Wachstumsfaktoren ohne Leader-Sequenz ausgeht. 30
 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man von Zelleinschlußkörpern eines Wachstumsfaktors ausgeht, dessen Moleküle, die die Zelleinschlußkörper bilden, sich aus einem einzigen Gen ableiten bzw. homogenisch sind.
 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man von Zelleinschlußkörpern zweier verschiedener Wachstumsfaktoren ausgeht, deren Moleküle, die die Zelleinschlußkörper bilden, sich aus verschiedenen Genen bzw. aus Genen ableiten, die für jeden Wachstumskörper spezifisch sind. 35
 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Moleküle der Einschußkörper eines oder beider Wachstumsfaktoren aus einem einzigen Gen ableiten bzw. homogenisch sind oder daß die Moleküle der Einschußkörper eines oder beider Wachstumsfaktoren heterogenisch sind. 40
 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man von Zelleinschlußkörpern eines Wachstumsfaktors einer Aminosäuresequenz aus der durch SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23 und SEQ ID NO. 24 gebildeten Gruppe ausgeht. 45
 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, daß man ein Dimer aus zwei gleichen Ketten einer Aminosäuresequenz aus der durch SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23 und SEQ ID NO. 24 gebildeten Gruppe gewinnt. 50
 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Dimer aus zwei verschiedenen Ketten mit Aminosäuresequenzen gewinnt, die man aus einer der folgenden Zusammenstellungen von Aminosäuresequenzen ausgewählt hat: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 und SEQ ID NO. 6; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 7 und SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 und SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11 und SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 11 und SEQ ID NO. 12; SEQ ID NO. 13 und SEQ ID NO. 14; SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20 und SEQ ID NO. 21; SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23 und SEQ ID NO. 24. 60
 17. Verwendung eines gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 gewonnenen biologisch aktiven Dimers von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten. 65

- Leerseite -